

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18590983  
 研究課題名（和文） 膵腺房細胞からインスリン分泌細胞への分化転換メカニズムの解明  
 研究課題名（英文） Elucidation of mechanism of transdifferentiation of pancreatic acinar cells into insulin-secreting cells

研究代表者  
 南 幸太郎 (MINAMI KOHTARO)  
 神戸大学・大学院医学研究科・准教授  
 研究者番号：80334176

研究成果の概要：インスリンを分泌する細胞を人工的に作製することは糖尿病の根治療法の開発に結びつく可能性があり社会的意義は大きい。研究代表者はすでに、膵臓で最も大量に存在する腺房細胞（消化酵素を産生・分泌する細胞）をインスリン分泌細胞へ変化させることに成功していたが、本研究ではそのメカニズムを解析し、細胞同士の接着が一旦破壊されて再度形成されることが、細胞特性の変化をもたらす原因であることを初めて明らかにした。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,900,000	0	1,900,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	480,000	3,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・代謝学

キーワード：エネルギー、糖代謝異常、再生医療

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の成体において組織あるいは臓器を構成する細胞は、大部分がそれぞれ特定の役割を持った機能的な成熟細胞へと分化している。このような成熟細胞でも状況に応じて脱分化や分化転換 (transdifferentiation) を生じて異なる特性を持つ細胞へ変化する場合があります、意外なほど高い可塑性を有することが明らかになりつつある。しかしながら、成熟細胞の持つ可塑性の分子的基盤については未だ不明な点が多い。

研究代表者らは最近、成体マウスの膵外

分泌領域に存在する細胞が膵β細胞に類似のインスリン分泌特性を持つ細胞へと分化誘導できることを発見した。形態的な特徴などから、誘導されたインスリン分泌細胞は膵腺房細胞に由来する可能性が高いと考え、下の図に示すような Cre/loxP システムを応用した cell lineage tracing 法によって、このことを直接的に証明した (PNAS 102:15116, 2005)。これは、成熟膵腺房細胞がインスリン分泌細胞へ分化転換できることを明確に証明した初めての報告である。これまでにも非β細胞をソースとしてインスリン分泌細胞を作製 (分化誘導) した

との報告は多いが、由来となる細胞が元々どのようなものであったのか、インスリン分泌機能が実際の $\beta$ 細胞にどの程度類似するものであるのか、また、どのようなメカニズムでインスリン分泌細胞へ変化したのかについてはほとんど明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、既に確立した培養系を用いて膵腺房細胞からインスリン分泌細胞への分化転換のメカニズムを解明することを目的とする。本研究により、成熟細胞の可塑性に関する分子的背景の一端が明らかになり、膵 $\beta$ 細胞の分化機構の理解に役立つ知見が得られるとともに、糖尿病再生医療実現化へ向けての科学的基盤が形成されることも期待される。

## 3. 研究の方法

成体マウスの膵腺房細胞を単離して特定の条件で培養すると、EGF受容体が活性化され、インスリン分泌細胞へ分化転換することは既に明らかにしていたので(Minami et al, PNAS, 2005)、以下の方法でそのメカニズムを解析した。

(1) 分化転換に必要な細胞内シグナルを明らかにするため、分化転換時に活性化(リン酸化)される分子をイムノブロッティングで解析した。

(2) 低分子の阻害薬を利用してEGF受容体下流の各細胞内シグナル伝達経路を遮断し、分化転換への影響を検討した。評価はRT-PCRによる遺伝子発現変化を指標とした。

(3) 分化転換における細胞間相互作用の影響を検討するため、カドヘリン依存性細胞接着を免疫組織学的に解析し、さらに、中和抗体を用いて細胞間相互作用を遮断した時の影響を解析した、

## 4. 研究成果

(1) 膵腺房細胞からインスリン分泌細胞への分化転換

成体マウスの膵臓をコラゲナーゼ処理によって消化・分散し、膵島分離で用いられるFicollを用いた密度勾配遠心法にて非内分泌細胞が濃縮された沈渣の画分を得た。ここには、まだわずかに(0.5%程度) $\beta$ 細胞が混入しているので、亜鉛のキレート剤であるジチゾンで染色される細胞(インスリン顆粒を含む細胞)を実体顕微鏡下で除去した。こうして純化された細胞画分には、 $\beta$ 細胞は0.01%程度しか残存せず、90%以上の腺房細胞と5%未満の導管細胞が含まれる。この状態で10%の血清を含む培地で培養すると、上皮様の細胞が接着・伸展(一部増殖)してコロニー状の細胞集団を形成するが、やがて線維芽

細胞が増殖して培養皿の大部分を占めるようになってしまった。そこで、出発材料からできる限り線維芽細胞を除き、培養中の増殖も抑制する工夫をした。まず、10%の血清を含む条件で半日ほど培養して線維芽細胞をある程度接着させて浮遊している細胞のみを回収し、その後、血清濃度を落として培養することにした。様々な成長因子の添加を行いその効果を検討したところ、EGFを加えると細胞は最初の数日間は浮遊したままで表面が滑らかなspheroid状の塊になり、やがて接着して数十個から数百個程度の細胞を含むコロニーが多数形成された。約一週間後に免疫染色を行うと、比較的小型で密度の高い一部のコロニーの周縁部にインスリン陽性細胞が見られた。しかしながら、この条件ではインスリン含量が少なく、インスリン分泌反応を検討することは困難であった。そこで、細胞接着を抑制する特殊な培養皿で細胞塊を維持したまま培養を行ったところ、インスリン産生能の改善が認められた。

次に、誘導されたインスリン陽性細胞が膵臓のどの細胞に由来しているかを検討した。細胞分離直後にはほとんどの細胞がアマラーゼ陽性で、ごく一部(<5%)がサイトケラチン陽性であった。インスリン陽性細胞(混入した $\beta$ 細胞)もごくまれに観察されるが、周囲の細胞より明らかに小さく、他との区別は容易であった。培養4日目以降になるとアマラーゼの染色性は劇的に低下し、逆にサイトケラチン陽性の細胞の数が増加した。また、培養前にはほとんど見られない明確な管状の構造が多数認められるようになった。

誘導されたインスリン陽性細胞の形態的な特徴としては、実際の $\beta$ 細胞よりも大きく、しばしば二核のものが認められることである。また、インスリン、アマラーゼ、サイトケラチンの多重免疫染色を行うと、多くの場合これらのマーカーは共存しなかったが、一部でインスリンとアマラーゼの二重陽性細胞が認められた(図1A)。インスリンとサイトケラチンの二重陽性細胞は極めてまれで、特に、サイトケラチン強陽性の明確な管状構造の部分にはインスリン陽性細胞を見つけることができなかった(図1B)。

以上の結果から新たに誘導されたインスリン産生細胞は、膵腺房細胞に由来する可能性が高いと考えられたため、これを検証するためにCre-loxPシステムを応用したcell lineage tracingによって膵腺房細胞を選択的にマーキングして追跡した(図1C)。Creリコンビナーゼによって組換えが起きると蛍光タンパクを発現するレポーターマウスから膵細胞を単離し、アマラーゼプロモーターによってCreリコンビナーゼを発現するアデノウイルスを感染させてから培養し、イン

スリンとレポータータンパク (ECFP) の免疫染色を行ったところ、ECFP 陽性かつインスリン陽性の細胞が認められた (図 1 D)。これは、もともとアミラーゼを発現していた膵腺房細胞がインスリンを発現するようになったことを直接的に示している。膵腺房細胞から分化転換によって誘導されたインスリン産生細胞ではインスリンを含む分泌顆粒が形成され、グルコースなど生理的な刺激によってインスリンが分泌された。以上から、膵腺房細胞は分化転換によってインスリン分泌細胞に変化し得ることが証明された<sup>14)</sup>。なお、膵腺房細胞はサイトケラチン陽性細胞にも変化した (図 1 E)。

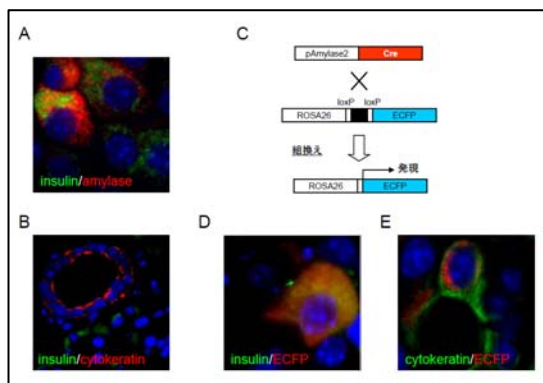


図 1. 膵腺房細胞の分化転換によるインスリン分泌細胞の誘導

### (2) 分化転換を誘導するシグナル

膵腺房細胞は単離培養後速やかにアミラーゼの発現を失い、EGF を添加した浮遊培養の条件では、Pdx1 や Foxa2、HNF6 など、膵臓の発生初期に見られる転写因子の発現が誘導された。培養後期には膵 β 細胞に特徴的な転写因子の発現も認められるようになった。興味深いことに、膵内分泌前駆細胞のマーカー候補でもある PGP9.5 の発現が培養膵腺房細胞で誘導された。成体マウスの β 細胞では、PGP9.5 の発現を免疫染色で検出できないが、腺房細胞由来のインスリン陽性細胞のほぼ全てが PGP9.5 を発現していた。これらの結果から、膵腺房細胞は培養によって未成熟な膵細胞の特性を備えた細胞へ変化 (脱分化) し、さらにインスリン分泌細胞などへ再分化するものと考えられた。また、得られたインスリン分泌細胞は完全に分化した β 細胞ではなく、分化の途上にある可能性が高い。

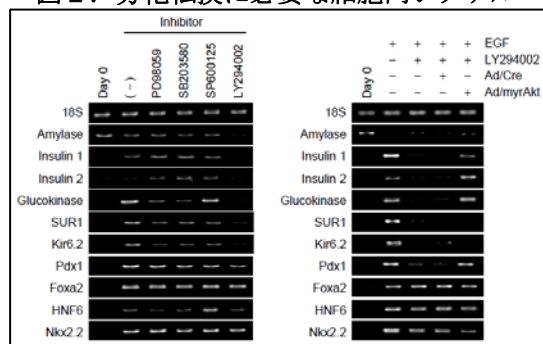
次に、膵腺房細胞がインスリン分泌細胞へ分化転換するときに必要なシグナルについても検討を行った。培地には EGF を添加しているので、培養膵腺房細胞では EGF 受容体下流の細胞内シグナルが活性化されているが、驚いたことに EGF を添加しなくても同様のシグナル活性化が認められ、さらには、分化転換を示す遺伝子発現の変化も EGF 添加と同様に

認められた。そこで、摘出した膵臓をそのまま急速凍結してタンパクを抽出した場合と、酵素的に分散してから抽出した場合とで EGF シグナルの変化を検討したところ、膵臓を分散することによって EGF 受容体のリン酸化が生じ、下流のシグナルも活性化されることが判明した。EGF 受容体キナーゼの阻害薬を添加して培養を行うと、膵腺房細胞における遺伝子発現の変化が著しく抑制されたことから、腺房細胞の分化転換には EGF シグナルの活性化が必須であることが明らかとなった。

### (3) 細胞間相互作用と分化転換

EGF 受容体下流の細胞内シグナルのうち、特にどの経路が膵腺房細胞からインスリン分泌細胞への分化転換に重要であるかを明らかにするため、入手可能なシグナル伝達経路の阻害薬を用いて解析を行った。Erk1/2 の阻害薬として PD98059、p38-MAP kinase 阻害薬として SB203580、JNK 阻害薬として SP600125、PI3 キナーゼ阻害薬として LY294002 を使用した。その結果、LY294002 を添加して培養した場合にはインスリン分泌細胞への分化転換を示す遺伝子発現の変化、すなわち、インスリンをはじめとする膵 β 細胞に特徴的な分子の発現誘導が著しく抑制された。さらに、LY294002 存在下で PI3 キナーゼ下流の主要なシグナル伝達分子である Akt の恒常活性型変異体を過剰発現させると、分化転換が生じた (図 2)。これらの結果は、PI3 キナーゼ/Akt 経路の活性化が膵腺房細胞からインスリン分泌細胞への分化転換に必須であること示している。

図 2. 分化転換に必要な細胞内シグナル



興味深いことに、単離した膵腺房細胞を LY294002 存在下で培養すると通常は形成される spheroid が形成されず (図 3 A)、カドヘリン依存性細胞接着が再形成されないことを見出した (図 3 B)。

膵腺房細胞は典型的な上皮細胞タイプの明確な細胞極性を示すが、単離・培養後は膜極性のはっきりしない膵島細胞タイプの細胞極性を示すように変化する。この一因として、もともとは内分泌細胞にしか発現していない N-CAM の発現誘導が関与している可能性

が考えられた (図4)。

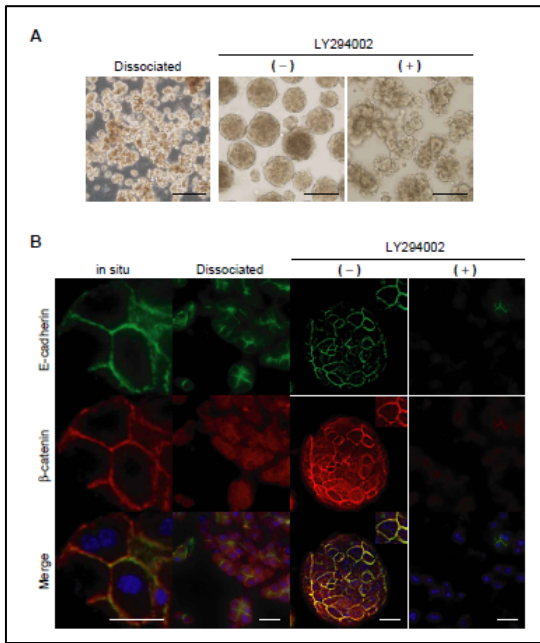


図3. カドヘリン依存性細胞接着の破壊と再構成

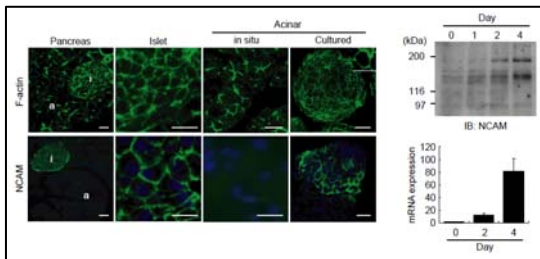


図4. 細胞極性の変化と N-CAM の発現誘導

単離した膵腺房細胞を EGF 存在下で培養すると E-カドヘリンと  $\beta$ -カテニンの発現が著しく増強されることを見出した。一方、LY294002 によって PI3 キナーゼ活性を阻害した条件では mRNA レベルでの発現増加は見られず、タンパクレベルでの分解が認められた。したがって、PI3 キナーゼの活性化が E-カドヘリンと  $\beta$ -カテニンの安定性に寄与して、単離膵腺房細胞におけるカドヘリン依存性細胞接着の再構成に作用しているものと考えられた。

次に、E-カドヘリンの中和抗体を利用して単離膵腺房細胞におけるカドヘリン依存性細胞接着を阻害し、spheroid の形成を抑制すると、インスリンをはじめとする膵  $\beta$  細胞に特徴的な遺伝子の発現誘導が強く抑制された (図5)。このことは、カドヘリン依存性細胞接着の再構成が膵腺房細胞からインスリン分泌細胞への分化転換において重要な役割を演じていることを示す結果である。

PI3 キナーゼ阻害薬や E-カドヘリンの中和抗体によってインスリン分泌細胞への分化

転換を阻害した場合でも、膵発生に関わる転写因子類の発現誘導は生じることに気づいた (図2、図5)。

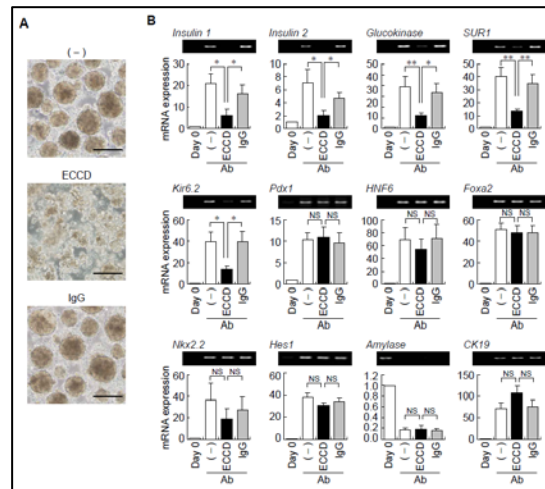


図5. E-カドヘリン中和抗体による分化転換の抑制

そこで、PI3 キナーゼ活性を阻害してカドヘリン依存性細胞接着の再構成を抑制した時の遺伝子発現の変化を定量 RT-PCR によって詳細に検討した。その結果、細胞接着を構成しない条件ではインスリンをはじめとする膵  $\beta$  細胞に特徴的な遺伝子の発現誘導は全く見られないが、膵発生に関わる転写因子 (特に Pdx1, HNF6, Foxa2, Hes1 など未分化細胞に発現するもの) の発現誘導が認められた (図6)。すなわち、カドヘリン依存性細胞接着のない条件下では、未分化な膵細胞への脱分化が生じているものと考えられた。

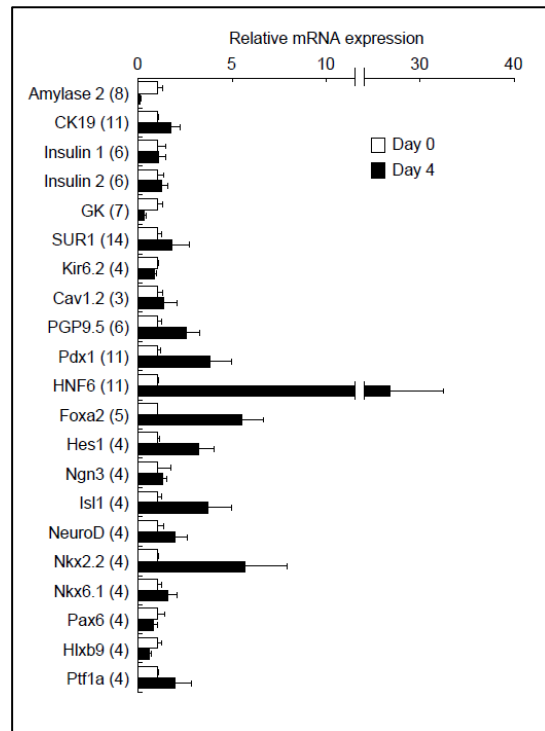
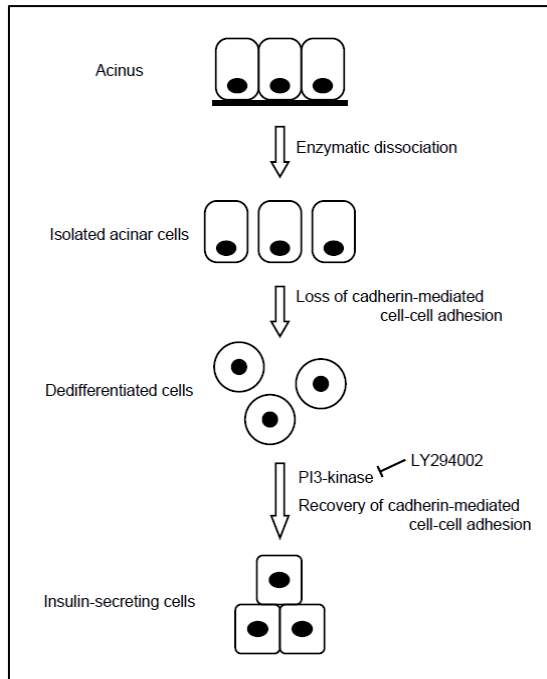


図6. 膵腺房細胞の脱分化誘導

さらに、このようにして脱分化した膵腺房細胞において、PI3 キナーゼの阻害を解除する (LY294002 を除去し EGF を添加する) とインスリン分泌細胞へ転換 (再分化) することが確認された。このとき、LY294002 を添加し続けるとインスリン分泌細胞は誘導されなかったことから、PI3 キナーゼの活性化は脱分化細胞からインスリン分泌細胞への再分化に作用することが明らかとなった。

以上の結果を考慮して、膵腺房細胞からインスリン分泌細胞への分化転換のメカニズムをまとめてモデル化すると図7のようになる。すなわち、膵腺房が酵素によって分散され単離されると、カドヘリン依存性細胞接着が失われ、脱分化が生じる。その後、PI3 キナーゼの活性化によってカドヘリン依存性細胞接着が再形成され、インスリン分泌細胞に分化転換するものと考えられる。

図7. 分化転換メカニズム



#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

#### 英文 (査読有)

- ① Minami K, Okano H, Okumachi A, and Seino S. Role of cadherin-mediated cell-cell adhesion in pancreatic exocrine-to-endocrine transdifferentiation. *J Biol Chem* 283:13753-13761, 2008
- ② Minami K and Seino S. Pancreatic acinar-to-beta cell

transdifferentiation in vitro. *Front Biosci* 13:5824-5837, 2008

- ③ Ishizuka N, Minami K, Okumachi A, Okuno M, and Seino S. Induction by NeuroD of the components required for regulated exocytosis. *Biochem Biophys Res Commun* 354:271-277, 2007
- ④ Okuno M\*, Minami K\* (\*equal contribution), Okumachi A, Miyawaki K, Toyokuni S, and Seino S. Generation of insulin-secreting cells from pancreatic acinar cells of animal models of type 1 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292:E158-E165, 2007
- ⑤ Oyama K, Minami K, Ishizaki K, Miki T, and Seino S. Spontaneous recovery from hyperglycemia by regeneration of pancreatic  $\beta$ -cells in Kir6.2G132S transgenic mice. *Diabetes* 55:1930-1938, 2006
- ⑥ Kawaguchi M\*, Minami K\* (\*equal contribution), Nagashima K, and Seino S. Essential role of ubiquitin-proteasome system in normal regulation of insulin secretion. *J Biol Chem* 281:13015-13020, 2006

#### 和文 (査読無)

- ⑦ 南幸太郎、清野進：膵・細胞の機能、再生と幹/前駆細胞、アンチエイジング医学 4:790-794, 2008
- ⑧ 南幸太郎、清野進：糖尿病治療における再生医学の可能性、*BioClinica* 23:366-370, 2008
- ⑨ 南幸太郎、清野進：膵臓の再生、日本臨床 66:926-931, 2008
- ⑩ 川口美穂、南幸太郎、清野進：インスリン分泌におけるユビキチン-プロテアソーム系の役割、内分泌・糖尿病科 25:250-257, 2007
- ⑪ 南幸太郎、清野進：膵腺房細胞からインスリン分泌細胞への分化転換、医学のあゆみ 220:1145-1148, 2007
- ⑫ 南幸太郎、清野進：膵腺房細胞の分化転換によるインスリン分泌細胞の誘導、最新医学 61:1496-1501, 2006
- ⑬ 南幸太郎、清野進：膵幹細胞からの再生、*Diabetes Frontier* 17:314-318, 2006

[学会発表] (計 15 件)

#### 国際学会

- ① Minami K, Miyawaki K, Seino S. A novel strategy for in vitro cell tracing reveals phenotypic reversibility of mouse pancreatic beta-cells. EMBO Workshop: Beta cell differentiation and regeneration (Peebles, UK), 2009

- 年 2 月 28 日
- ② Seino S, Hagiwara Y, Minami K. Induction of insulin-secreting cells from pancreatic acinar cells in vitro and its mechanism. EMBO Workshop: Beta cell differentiation and regeneration (Peebles, UK), 2009 年 2 月 28 日
  - ③ Minami K. Mechanism of pancreatic exocrine-to-endocrine transdifferentiation. Asia Islet Biology & Incretin Symposium (Incheon), 2008 年 10 月 19 日
  - ④ Minami K., Okano H, and Seino S. Role of cadherin-mediated cell-cell adhesion in transdifferentiation of pancreatic acinar cells. 44th Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes (Rome), 2008 年 9 月 8 日
  - ⑤ Minami K., and Seino S. Signaling mechanism of in vitro transdifferentiation of pancreatic acinar cells. 6th Catholic International Stem Cell Symposium (Seoul), 2008 年 6 月 20 日
  - ⑥ Minami K., Miyawaki K, Okuno M, and Seino S. Plasticity of pancreatic cells. 19th FAOBMB (Seoul), 2007 年 5 月 28 日

#### 国内学会

- ⑦ 南幸太郎、岡野宏俊、清野進：カドヘリン依存性細胞接着による膵細胞分化転換制御、第 51 回日本糖尿病学会年次学術集会（東京）、2008 年 5 月 24 日
- ⑧ 尾山和信、川口美穂、鏑木康志、南幸太郎、三木隆司、清野進、安田和基：血糖値回復に至るための膵β細胞再生機構の解明、第51回日本糖尿病学会年次学術集会（東京）、2008年5月24日
- ⑨ 南幸太郎：膵β細胞再生へのアプローチ、第48回三九会（神戸）、2008年3月29日
- ⑩ 南幸太郎：Strategies for regeneration of pancreatic  $\beta$ -cells、第9回インスリンリサーチフォーラム（大阪）、2007年11月17日
- ⑪ 南幸太郎、宮脇一真、奥野正顕、清野進：Phenotypic plasticity of pancreatic cells、第25回内分泌代謝学サマーセミナー（淡路）2007年7月17日
- ⑫ 南幸太郎、岡野宏俊、奥町彰礼、石塚伸子、清野進：膵腺房細胞における分化の可塑性、第80回日本内分泌学会学術総会（東京）、2007年6月15日
- ⑬ 石塚伸子、南幸太郎、奥町彰礼、奥野正顕、清野進：転写因子NeuroDによる調節

性開口放出機能誘導、第50回日本糖尿病学会年次学術集会（仙台）、2007年5月26日

- ⑭ 南幸太郎、宮脇一真、奥野正顕、清野進：シンポジウム「膵島移植と再生」：膵細胞の可塑性、第50回日本糖尿病学会年次学術集会（仙台）、2007年5月25日
- ⑮ 尾山和信、南幸太郎、石崎勝彦、布施雅規、三木隆司、清野進：Kir6.2G132Sトランスジェニックマウスにおける膵β細胞再生機構、日本分子生物学会2006フォーラム（名古屋）、2006年12月7日

#### 〔図書〕（計3件）

- ① 尾山和信、南幸太郎、三木隆司、清野進：Kir6.2G132S TGマウス：*in vivo*における膵・細胞再生のモデル、分子糖尿病学の進歩 基礎から臨床まで-2008 金原出版 p. 29-39, 2008
- ② 南幸太郎、奥野正顕、宮脇一真、清野進：膵腺房細胞の分化転換によるインスリン分泌細胞の作出、糖尿病学 2007 診断と治療社 p. 84-91, 2007
- ③ 南幸太郎、清野進：膵腺房細胞の分化転換による・細胞再生の可能性、分子糖尿病学の進歩 基礎から臨床まで-2007 金原出版 p. 22-26, 2007

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

南 幸太郎 (MINAMI KOHTARO)  
神戸大学・大学院医学研究科・准教授  
研究者番号：80334176

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし